第 37 卷第 19 期 生 态 学 报 Vol.37,No.19
2017 年 10 月 ACTA ECOLOGICA SINICA Oct.,2017

DOI: 10.5846/stxb201607071390
周丽娜,周静,李辉信,胡锋,徐莉.镉对苯并(a)芘在蚯蚓亚细胞组分中分配积累的影响.生态学报,2017,37(19):6616-6623.
Zhou L N, Zhou J, Li H X, Hu F, Xu L.Effects of cadmium on the distribution and accumulation of benzo[a]pyrene in subcellular fractions of *Eisenia fetida*.Acta Ecologica Sinica,2017,37(19):6616-6623.

镉对苯并(a)芘在蚯蚓亚细胞组分中分配积累的影响

周丽娜,周 静,李辉信,胡 锋,徐 莉*
南京农业大学, 南京 210000

摘要:通过外源添加不同浓度镉离子(Cd^{2+})来研究复合污染条件下镉(Cd)对苯并(a)芘(BaP)在蚯蚓体内不同亚细胞组分(组分 C:细胞溶质组分;组分 D:固体颗粒组分;组分 E:细胞碎片组分)中的分配积累情况,并探究其内在机制。结果表明,BaP 主要分布于蚯蚓的细胞碎片组分,其次为固体颗粒组分,在细胞溶质组分中的浓度最低。在 Cd^{2+}添加处理下,随着 Cd^{2+}浓度的增加,3 个细胞组分中的 BaP 浓度呈先降低后升高的趋势。随着 Cd^{2+}浓度的增加,3 个亚细胞组分中的蛋白含量与乙酰胆碱酯酶(AChE)活性均呈先升高后下降的趋势;而蚯蚓细胞溶质和细胞碎片组分中的谷胱甘肽 S-转移酶(GST)活性呈先下降后上升的趋势,但固体颗粒组分中逐渐增加。相关性分析表明,蚯蚓细胞溶质和细胞碎片组分中的蛋白含量与其对应组分中的 BaP 浓度呈显著负相关;细胞溶质组分中的 AChE 活性与该组分中的 BaP 浓度呈显著负相关;而 GST 的活性与 BaP 浓度没有显著相关性。综上所述,BaP 主要分配积累在细胞碎片组分中,Cd^{2+}可能通过影响蛋白含量及 AChE 的活性,从而影响 BaP 在细胞碎片和细胞溶质组分中的积累,使得 BaP 的浓度随着 Cd^{2+}浓度的增加呈现先降低后升高的趋势。

关键词:苯并(a)芘;镉;赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*);亚细胞组分;复合污染

Effects of cadmium on the distribution and accumulation of benzo[a]pyrene in subcellular fractions of *Eisenia fetida*

ZHOU Lina, ZHOU Jing, LI Huixin, HU Feng, XU Li*
Nanjing Agricultural University, *Nanjing* 210000, *China*

Abstract: This experiment explored the mechanism underlying benzo[a]pyrene (BaP) distribution in different subcellular fractions of the earthworm *Eisenia fetida* (Fraction C: associated with the cytosol; Fractions D: associated with granules; and Fraction E: associated with tissue fragments and cell membranes) under conditions of contamination with both BaP and cadmium ions (Cd^{2+}) at different concentrations. The results showed that Cd^{2+} inhibited the accumulation of BaP in the earthworm, and that BaP was accumulated to the greatest extent in Fraction E, followed by Fraction C and Fraction D. With the addition of Cd^{2+}, BaP concentrations in the three fractions initially decreased, but subsequently increased with the increasing concentration of Cd^{2+}, whereas protein content and acetylcholinesterase (AChE) activity showed the opposite trend. In contrast, glutathione s-transferase (GST) activity initially decreased and then subsequently increased with increasing Cd^{2+} concentration in Fraction C and E, whereas the activity gradually increased in Fraction D. Correlation analysis indicated that protein content showed a significant negative correlation with BaP concentration in Fraction C and E; AChE activity showed a significant negative correlation with BaP concentration in Fraction C; and GST activity showed a non-significant correlation with BaP concentration. Collectively, the results indicate that BaP mainly accumulated in Fraction E, and that the accumulation of BaP in Fraction C and E was correlated with the content of protein and activity of

基金项目:国家自然科学基金(41371469);公益性行业(农业)科研专项经费(201503121);江苏省优势学科项目资助
收稿日期:2016-07-07; **网络出版日期**:2017-05-27

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: xuli602@ njau.edu.cn

AChE, which was influenced by Cd^{2+}. Furthermore, BaP concentration initially decreased, but subsequently increased, with the increasing concentration of Cd^{2+}.

Key Words: benzo[a]pyrene; cadmium; *Eisenia fetida*; subcellular fraction; combined pollution

重金属和多环芳烃(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs)是土壤环境中重要的两类污染物,它们往往同时存在形成复合污染[1]。这不仅严重损害土壤生态系统,同时给人类健康带来风险[2-3],因此,对复合条件下污染物的毒性测定及环境生态风险评估十分必要[4]。

我国污染土壤普查表明[5]:重金属镉(Cd)被确定为中国土壤污染的首要污染物,在占中国国土三分之二的 630 万 km^2 被调查的土地上,有 7%的点位被测出镉超标。苯并(a)芘(BaP)具有细胞毒性、致突变性及致癌性,是多环芳烃中最受关注的污染物之一[6-9]。它们可以通过工业排放、化肥施用、污水灌溉、污泥农用等途径进入农田系统,形成复合污染,这不仅对作物生长和发育产生不良影响,而且会通过食物链对人和动物健康构成威胁,是目前环境科学领域研究的热点之一[10-11]。

蚯蚓是土壤中生物量最大的动物类群之一,它不仅在维持生态系统功能中起着不可替代的作用(如促进土壤有机质的分解、养分循环与释放,改善土壤性状等),而且也是土壤污染状况的重要指示生物。多个国家和组织利用蚯蚓进行污染物的生态风险评价,特别是赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),以其对污染物敏感性高、实验可操作性强,而被经济合作与发展组织选作评估污染物毒性的模式动物,并建立了相应的标准测试流程[12]。

目前,国内外的研究多专注于重金属或多环芳烃单一或复合条件下对蚯蚓的生态毒性效应。单一污染下,王慧[13]等报道了镉暴露会对赤子爱胜蚓体内的纤维素酶活性产生抑制作用,张薇等[14]研究表明苯并(a)芘可以诱导蚯蚓体内细胞色素 P450 含量的增加,同时又抑制了超氧化物歧化酶(SOD)的活性;复合污染下,赵作媛[15]发现镉和菲复合污染会对蚯蚓的毒性产生拮抗作用,且随镉浓度升高其降低菲毒性的程度降低,朱江[16]也报道了重金属(Cd)和典型多环芳烃菲(Phe)复合污染对安德爱胜蚓(*Eisenia andrei*)和白线蚓(*Fridericia bulbosa*)的毒性效应,发现污染物的组成以及浓度影响复合污染的交互作用类型,表现出或拮抗或协同的毒性效应,生物体内的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性变化可作为表征 Cd-Phe 复合污染的一项重要的参考指标。

虽然毒性效应的研究有了一定的积累,但至今对于不同类型污染物复合条件下,污染物在蚯蚓体内分配积累特征的研究为数不多。与此同时,以往的毒性试验主要集中于研究污染物在蚯蚓个体水平上的分布特征,而忽视了基于蚯蚓亚细胞水平或分子水平上污染物的行为[17-19]。而污染物在蚯蚓体内的行为特征,特别是污染物在亚细胞水平上的分布,更有助于揭示蚯蚓对污染物的固定和解毒策略,并且一些重要的生态毒理学资料必须从亚细胞水平上才能获得[20-21]。本研究室前期基于土壤污染暴露环境下的研究表明,单一 Phe 污染下,赤子爱胜蚓的不同亚细胞组分中 Phe 的浓度存在差异,并通过 Phe 的浓度差异推断 Phe 在蚯蚓体内的分配过程[22],故对污染物在蚯蚓亚细胞水平上的积累分布的研究可以更好地评价污染物的毒性及阐明蚯蚓对污染物的固定和解毒机制。

一些研究表明,部分蚯蚓的生理生化指标可以用于评价污染物积累分配特征。如蛋白的含量,污染物可以通过诱导蚯蚓体内部分蛋白酶的表达,促进蛋白浓度的提高,从而提供与污染物的结合位点,促进污染物的积累[21];乙酰胆碱酯酶(AChE)是生物神经传导中的一种关键性酶,该酶降解乙酰胆碱(ACh),保证神经信号在生物体内的正常传递,它可能通过影响生物体的正常生理代谢过程,影响生物对污染物的转化代谢[23-25];谷胱甘肽 S-转移酶(GST)也被发现在生物体对外源污染物代谢解毒以及分配过程中起着重要的作用[26],如影响各细胞分室间对化学物质的结合和运输功能[27],可以通过转运蛋白将污染物运入液泡达到去毒作用等[28-30]。

综上所述,本研究通过构建复合污染条件,即在一定浓度 BaP 污染处理下,同时添加不同浓度的 Cd^{2+},采用半静态溶液培养 7d,之后对蚯蚓亚细胞组分中 BaP 的积累分布特征进行研究,同时测定蚯蚓各组分中的蛋白含量,乙酰胆碱酯酶以及谷胱甘肽 S-转移酶的活性,通过研究以上生化指标与 BaP 的相关性来尝试揭示在复合污染下 Cd 对 BaP 在蚯蚓亚细胞组分中分配积累的影响机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)购自安徽蚯蚓养殖基地。选用大小及体重相近(300—500 mg),成熟且带有环带的健康蚯蚓作为受体[12]。

苯并(a)芘为分析纯,纯度为 98%,购于百灵威科技有限公司。氯化镉($CdCl_2$)为分析纯,纯度为 99%,选自阿拉丁试剂。

1.2 实验设计

本实验采用半静态溶液培养方法进行略加修改[31]。50 mg/L BaP 模拟培养液配制如下:采用硝酸钙($Ca(NO_3)_2$)、硫酸镁($MgSO_4$)、硝酸钠($NaNO_3$)及硝酸钾(KNO_3)配制成 0.1 mmol/L Ca^{2+}, 0.1 mmol/L Mg^{2+}, 1.0 mmol/L Na^+及 0.1 mmol/L K^+浓度的模拟液,BaP 以丙酮溶解,溶于模拟液至终浓度为 50 mg/L,丙酮体积终浓度为 1‰。在此基础上,设定 4 个处理,即添加不同浓度的 $CdCl_2$,使得 Cd^{2+}终浓度为 0,0.2,0.5,0.8 mg/L,备用。

实验采用玻璃培养皿,每个培养皿中放入 10 条蚯蚓及 20 mL 污染物模拟水溶液并用封口膜封住,膜上扎上小口,防止蚯蚓逃逸且保证通气,于(20±1) ℃培养箱中避光培养。每天挑除死亡蚯蚓,并更换培养液,第 7 天进行采样,用液氮杀死后储存于-70 ℃冰箱。每个处理设定 4 个重复。

1.3 亚细胞分组

本实验将蚯蚓分为 3 个亚细胞组分。具体过程如下:蚯蚓融化后放置于含有 5 mL 冰冷的 Tris-HCl (0.01 mol/L,pH=7.0) 缓冲液匀浆瓶中,在 1500 r/min 条件下匀浆 5 min (组织匀浆器 DY89-2,宁波生物技术公司)。然后匀浆液在高速冷冻离心机中(Sigma 3K 30, Sigma 公司),分别在 10000 r/min,4 ℃条件下离心 30 min,收集上清(细胞溶质部分)。得到的沉淀加入 2 mL 氢氧化钠(NaOH)溶液(1 mol/L)进行充分消解,并继续在高速冷冻离心机中,分别在 10000 g,20 ℃条件下离心 10 min,收集上清(细胞碎片部分)及沉淀(固体颗粒部分)。收集的 3 个组分冷冻后置于 ALPHA 1-2 LD plus 冷冻干燥器中干燥。最后样品储存于 -70 ℃冰箱中,等待进一步测定。

1.4 苯并(a)芘测定

苯并(a)芘的提取参考 Contreras-Ramos 等[32]的方法,并略加改动。蚯蚓经过预处理后,固体组分称重后与 3 倍于其质量的无水硫酸钠(Na_2SO_4)混合后,置于研钵中磨成粉末。将粉末转移到棕色玻璃离心管中(40 mL,安捷伦公司,美国),加入 15 mL 二氯甲烷作萃取剂,密封。将离心管置于加有冰水的超声波清洗器中进行超声萃取 1 h,然后在一个涡旋仪在涡旋 60 s,再次超声 1 h,提取液在 3500 r/min 条件下离心 15 min,提取上清液。此过程重复 2 次。上清液合并后移取 6 mL,并过加有 3 g 柱层层析硅胶的硅胶柱,用 11 mL 1:1 的二氯甲烷和正已烷溶液分两次洗脱;洗脱液收集至旋转蒸发瓶中,在 40 ℃ 水浴条件下旋转蒸发,浓缩至干。用 2 mL 甲醇进行溶解定容,过 0.22 μm 有机滤膜后上机分析。

苯并(a)芘测定采用反相高效液相色谱(LC-20AT, 日本 Shimadzu 公司) 测试, 并配有紫外-可见检测器(SPD-20A),色谱柱为 C18 柱(Shim-pack VP-ODS, 250× 4.6 mm, 5 μm),保护柱为 C18 柱(Shim-pack GVP-ODS, 10× 4.6 mm, 5 μm)。色谱条件如下:流动相为色谱纯级甲醇,流动相均为每次测样前过 0.45 μm 滤膜并超声脱气;在流速 1.0 mL/min 下实行等度洗脱;柱温 30 ℃;检测波长 254 nm;进样量 20 μL。根据出峰时间定性,根据峰面积由外标法定量。检测信号由 HW-2000 色谱工作站(南京千谱软件有限公司)记录并处理

数据。

1.5　生化测定

蚯蚓不同亚细胞组分中,蛋白含量采用考马斯亮蓝比色法测定,通过测定 595 nm 波长下的吸光度可计算出蛋白的含量;乙酰胆碱酯酶的活力采用 TNB(对称三硝基苯, Sym-Trinitrobenzene)比色法测定,在 412 nm 波长下测定吸光度,酶活性单位以每毫克组织蛋白在 37 ℃保温 6 分钟,水解反应体系中 1 μmol 基质为 1 个活力单位,结果表示为 U/mgprot;谷胱甘肽-S-转移酶的活力采用分光光度计法,在 412 nm 波长下测定吸光度,通过催化谷胱甘肽(GSH)与 1-氯-2, 4 二硝基苯(CDNB)的结合来表征,酶活性单位以每毫克组织蛋白,在 37 ℃反应 1min 扣除非酶促反应,使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为 1 个酶活力单位。以上测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.6　数据分析

试验结果采用 SPSS 20.0 数据处理软件进行统计分析,用单因素方差分析法(one-way ANOVA)中的 Duncan 法进行不同浓度 Cd^{2+} 处理样本间的差异显著性分析($P < 0.05$),采用 Pearson 相关性来分析生化测定结果与对应 BaP 含量的相关性($P < 0.05$),均采用 OriginPro 9.0 软件作图。

2　结果

2.1　镉对蚯蚓体内苯并(a)芘分配积累的影响

由图 1 可得,与空白相比,添加 Cd^{2+} 的处理下,蚯蚓体内的 BaP 的积累量均显著降低。且随着 Cd^{2+} 浓度的升高,蚯蚓体内 BaP 的浓度呈现先降低后升高的趋势,并在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理中,BaP 的浓度达到最小值。

比较蚯蚓不同亚细胞组分对 BaP 的积累(图 1)可得,相同处理下,BaP 主要集中积累于蚯蚓的细胞碎片组分内,其次为固体颗粒组分,在细胞溶质组分中的积累量最低。不同浓度 Cd^{2+} 的添加能够抑制 BaP 在细胞碎片和固体颗粒物中的积累,并在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理中达到最小值,但是 0.8 mg/L Cd^{2+} 处理促进了细胞溶质组分中 BaP 的积累。

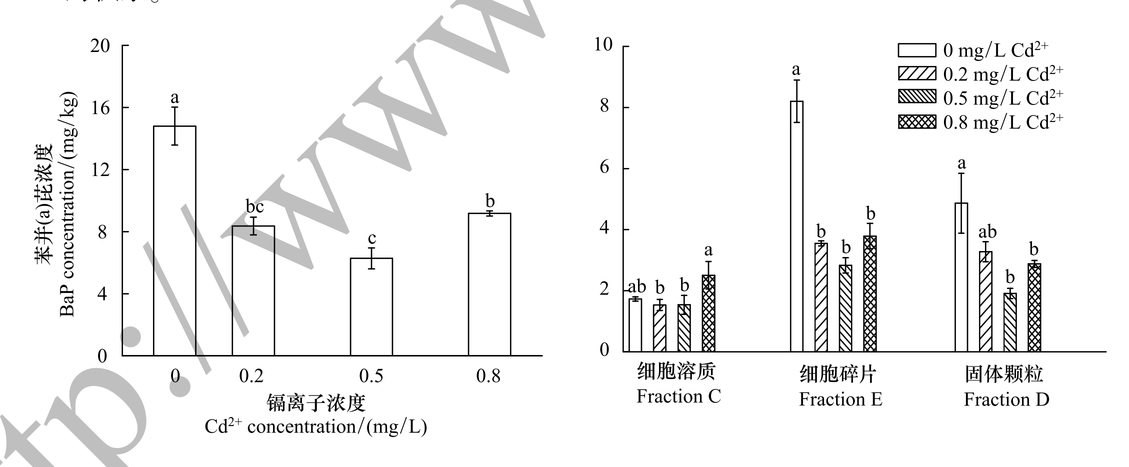


图 1　不同浓度 Cd^{2+} 对蚯蚓体内苯并(a)芘分配积累的影响

Fig.1　Effcet of different concentration of Cd^{2+} on the distribution and accumulation of BaP in the earthworm

a. 代表个体总量,b. 代表不同亚细胞组分分布

2.2　镉对蚯蚓体内蛋白含量的影响

由图 2 可得,蚯蚓体内的总蛋白含量随着 Cd^{2+} 浓度的增加呈先上升后下降的趋势,在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理下蛋白含量显著增加。

比较蚯蚓各亚细胞组分中的蛋白含量(图 2)可知,相同处理下,细胞碎片组分中的蛋白含量最高,其次为细胞溶质组分,固体颗粒组分中最少。在添加 Cd^{2+} 的处理下,各组分中的蛋白含量均呈先上升后下降的趋势,在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理中显著增加至最大值,随后在 0.8 mg/L Cd^{2+} 处理中又出现不同程度的降低。

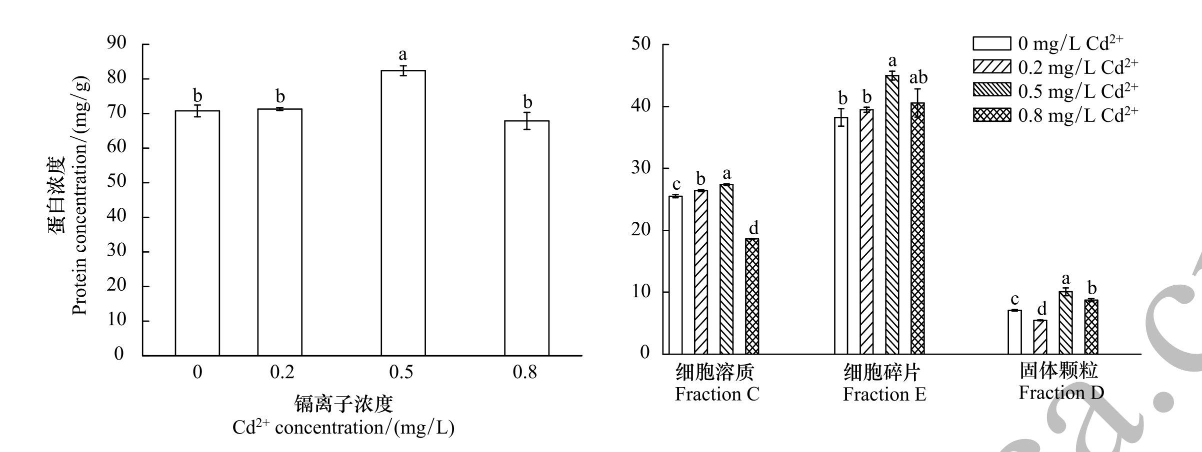


图 2 不同浓度 Cd^{2+} 对蚯蚓体内蛋白浓度的影响

Fig.2 Effcet of different concentration of Cd^{2+} on the concentration of protein in the earthworm

2.3 镉对蚯蚓体内乙酰胆碱酯酶活力的影响

由图 3 可知,蚯蚓体内总乙酰胆碱酯酶活力呈先上升后下降的趋势,在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理下显著增加,达到最大值,随后在 0.8 mg/L Cd^{2+} 处理下显著降低,达到最小值。

比较各亚细胞组分中的乙酰胆碱酯酶活力(图 3)可得,相同处理下,细胞碎片组分中的乙酰胆碱酯酶活力最高,其次为细胞溶质和固体颗粒组分。在添加 Cd^{2+} 的处理下,细胞溶质组分中乙酰胆碱酯酶的活力随着 Cd^{2+} 浓度的增加呈逐渐降低的趋势;而细胞碎片和固体颗粒组分中乙酰胆碱酯酶的活力呈先上升后下降的趋势,均在 0.5mg/L Cd^{2+} 处理下达到最大值,随后在 0.8 mg/L Cd^{2+} 处理下又有所降低。

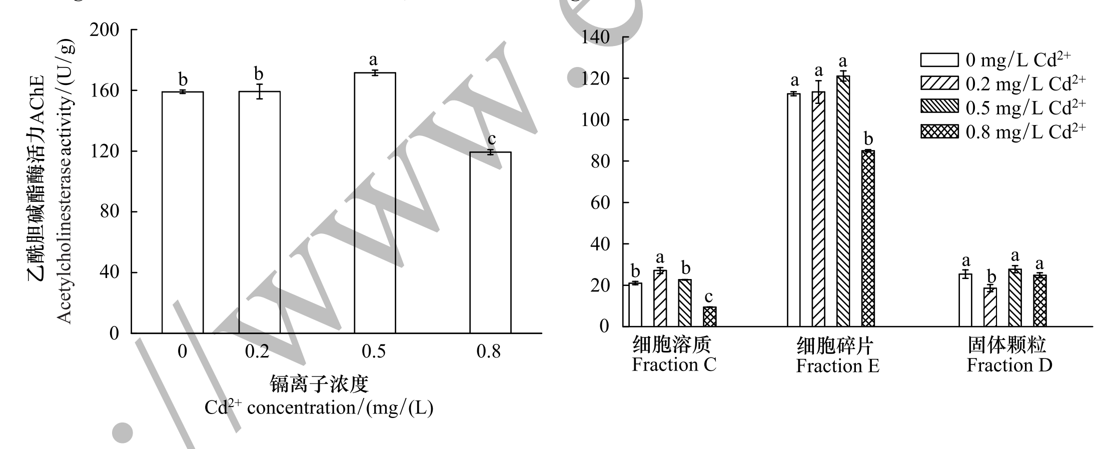


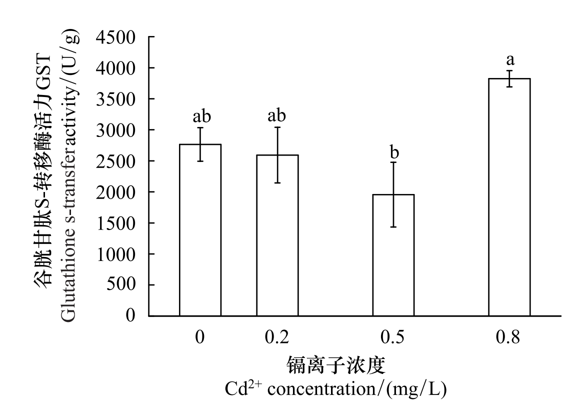
图 3 不同浓度 Cd^{2+} 对蚯蚓体内乙酰胆碱酯酶活力的影响

Fig.3 Effcet of different concentration of Cd^{2+} on the activity of AChE in the earthworm

2.4 镉对蚯蚓体内谷胱甘肽 S-转移酶活力的影响

由图 4 可知,蚯蚓体内总谷胱甘肽 S-转移酶活力随着 Cd^{2+} 浓度的增加呈先降低后升高的趋势,在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理下达到最小值,随后在 0.8 mg/L Cd^{2+} 处理下显著增加达到最大值。

比较各亚细胞组分中的谷胱甘肽 S-转移酶活力(图 4)可知,细胞溶质与细胞碎片组分中中谷胱甘肽 S-转移酶活力总体相近,而在固体颗粒组分中较低。Cd^{2+} 能增加细胞溶质及固体颗粒组分中谷胱甘肽 S-转移酶的活性,而抑制细胞碎片中谷胱甘肽 S-转移酶的活性。在添加 Cd^{2+} 的处理下,细胞溶质和细胞碎片组分中的谷胱甘肽 S-转移酶活性都呈先下降后上升的趋势,并在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理下达到最小值,随后又在 0.8 mg/L Cd^{2+} 处理下显著增加,而固体颗粒组分中谷胱甘肽 S-转移酶活性随着 Cd^{2+} 浓度的增加在 0.8 mg/L Cd^{2+} 处理下显著增加。



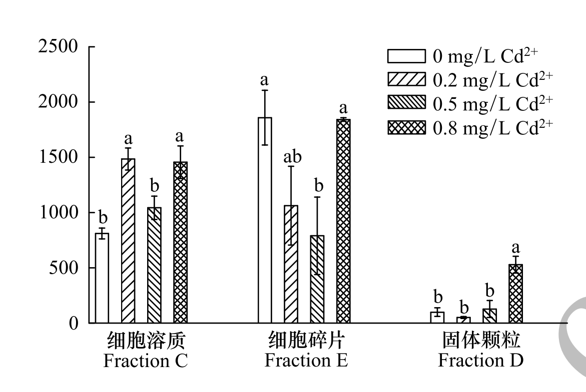


图 4　不同浓度 Cd^{2+} 对蚯蚓体内谷胱甘肽 S-转移酶活力的影响

Fig.4　Effcet of different concentration of Cd^{2+} on the activity of GST in the earthworm

2.5　相关性分析

通过相关性分析可得，不同浓度 Cd^{2+} 添加处理下，细胞溶质组分中的蛋白浓度及乙酰胆碱酯酶活力与细胞溶质组分中的 BaP 积累量呈显著负相关；细胞碎片组分中的蛋白浓度与细胞碎片组分中的 BaP 积累量呈显著负相关（表 1）。

表 1　不同亚细胞组分中酶活指标与苯并(a)芘浓度之间的相关性分析

Table 1　Correlation analysis between enzyme activity and BaP concentration in different subcellular fractions

酶活指标 Enzyme activities	细胞溶质 Fraction C, cytosol fration	固体颗粒 Fraction D, granules fration	细胞碎片 Fraction E, debris fraction
蛋白 Protein	-0.702 *	-0.456	-0.591 *
乙酰胆碱酯酶 AChE	-0.635 *	-0.001	0.048
谷胱甘肽 S-转移酶 GST	0.231	-0.102	0.494

AChE: acetylcholinesterase ;GST: glutathione s-transfer; * 表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关

3　讨论

本研究结果显示，不同浓度 Cd^{2+} 对 BaP 的积累有不同程度的抑制作用，蚯蚓体内的总 BaP 浓度在 0.5 mg/L Cd^{2+} 处理组时达到最小值，随后又有所回升，但均小于不添加 Cd^{2+} 的处理，且 BaP 主要集中积累在细胞碎片组分中，其次为固体颗粒组分，在细胞溶质组分中的积累量最少。这与段晓尘[33] 的研究结果一致，这可能是因为细胞碎片组分中含有细胞膜等物质，具有较强的亲脂性，易与疏水性的化学物质相结合，而 BaP 是一种疏水性有机污染物，从而 BaP 在细胞碎片组分中的积累量增加[22,34]。

BaP 处理下，蚯蚓 3 个亚细胞组分中的蛋白浓度均随外加镉离子浓度的增加呈先增加后减少的趋势。由相关性分析可得，细胞溶质与细胞碎片组分中 BaP 浓度与蛋白浓度呈显著负相关，这可能是因为随着 Cd^{2+} 浓度的增加，促进了生物体内与金属解毒、贮藏和体内平衡作用有关的蛋白的合成，例如金属硫蛋白(Metallothionein, MT)[35-36]，多个研究表明，镉暴露可以促进金属硫蛋白基因的表达[33]，并通过金属硫蛋白对镉的吸附，促进镉进入蚯蚓体内并增加积累[37]。此外，Mosleh 等[38] 研究发现有机污染物-除草剂异丙隆的暴露也可以促进水生颤蚓(*Tubifex tubifex*)中金属硫蛋白含量的增加。而金属硫蛋白对重金属的高度亲和性导致 BaP 与蛋白的结合受到 Cd^{2+} 的竞争抑制作用，从而降低了 BaP 在蚯蚓体内的积累量；反之，在高浓度 Cd^{2+} 浓度下，蚯蚓蛋白表达受到抑制，从而降低镉在蚯蚓体内的积累，减弱了相互的竞争，促进了 BaP 在蚯蚓体内的积累。

复合污染下，随着 Cd^{2+} 浓度的增加，3 个亚细胞组分中的乙酰胆碱酯酶活力随着 Cd^{2+} 浓度的增加呈先增加后降低的趋势，同时，高欢欢[39] 在 Cd 胁迫下研究麦长管蚜体内乙酰胆碱酯酶基因表达，以及赵诏[23] 在 Cd

暴露下研究家蚕体内乙酰胆碱酯酶活力变化,均获得了类似的结果,即镉对乙酰胆碱酯酶活力的影响呈低浓度刺激,高浓度抑制的现象。低浓度 Cd^{2+} 处理下生物体会表现出毒物兴奋效应,促进 AChE 的表达,会对生物体的正常代谢有促进作用,反之,高浓度 Cd^{2+} 处理下会表现出毒物抑制效应,抑制了 AChE 的活性,对生物体正常的生理代谢过程产生抑制作用[23,40-41],同时,生物体中生理生化过程的改变会影响污染物的代谢转化。本研究发现细胞溶质组分中的 BaP 浓度与乙酰胆碱酯酶活力呈显著负相关,这可能就是因为低浓度 Cd^{2+} 诱导了 AChE 的表达,促进蚯蚓对 BaP 的代谢解毒作用,从而导致了 BaP 浓度的降低,而高浓度 Cd^{2+} 抑制了 AChE 的表达,减弱了蚯蚓对 BaP 的代谢解毒作用,故 BaP 浓度呈现增加的趋势。

谷胱甘肽-S-转移酶在生物体解毒外源污染物过程中起着重要的作用。谷胱甘肽在分子抗氧化机理中起着关键作用,它可以通过谷胱甘肽 S-转移酶作用与异生物质结合,生成亲水的谷胱甘肽衍生物,通过排泄的方式排出体外,具有降低化学反应活性的效应[42-43]。但由本试验可得,蚯蚓体内各组分中 BaP 的浓度与谷胱甘肽 S-转移酶活力之间虽然没有显著相关性,但是随着 Cd^{2+} 浓度的增加,谷胱甘肽 S-转移酶的活力呈先下降,随后又上升的趋势,这与 Lei 等[44]的研究一致,谷胱甘肽 S-转移酶能够参与外源污染物的代谢,随着污染暴露时间以及浓度存在先抑制后恢复的过程。

4 结论

综上所述,Cd^{2+} 显著抑制了 BaP 在蚯蚓体内的总积累量,BaP 主要集中积累在细胞碎片组分中,其次为固体颗粒组分,在细胞溶质组分中的积累量最少。Cd^{2+} 的加入可以抑制 BaP 在细胞碎片和固体颗粒组分中 BaP 的积累,但高浓度的 Cd^{2+} 促进了细胞溶质组分中 BaP 的积累。Cd^{2+} 可能通过诱导乙酰胆碱酯酶的表达,促进了机体对外源污染物的防御能力及代谢作用,从而减弱 BaP 的积累。

参考文献(References):

[1] Mielke H W, Wang G D, Gonzales C R, Powell E T, Le B, Quach V N. PAHs and metals in the soils of inner-city and suburban New Orleans, Louisiana, USA. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2004, 18(3): 243-247.

[2] 高岩, 骆永明. 蚯蚓对土壤污染的指示作用及其强化修复的潜力. 土壤学报, 2005, 42(1): 140-148.

[3] Ping L F, Luo Y M, Zhang H B, Li Q B, Wu L H. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in thirty typical soil profiles in the Yangtze River Delta region, east China. Environmental Pollution, 2007, 147(2): 358-365.

[4] 朱永恒, 濮励杰, 赵春雨, 王宗英. 土地污染的一个评价指标: 土壤动物. 土壤通报, 2006, 37(2): 373-377.

[5] 中华人民共和国环境保护部. 环境保护部和国土资源部发布全国土壤污染状况调查公报. [2016-07-10]. http://www.zhb.gov.cn/gkml/hbb/qt/201404/t20140417_270670.htm.

[6] Binelli A, Riva C, Cogni D, Provini A. Assessment of the genotoxic potential of benzo(a)pyrene and *pp′*-dichlorodiphenyldichloroethylene in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Mutation Research, 2008, 649(1/2): 135-145.

[7] Juhasz A L, Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*] pyrene. International Biodeterioration & Biodegradation, 2000, 45(1/2): 57-88.

[8] Tung E W Y, Philbrook N A, Belanger C L, Ansari S, Winn L M. Benzo[a]pyrene increases DNA double strand break repair *in vitro* and *in vivo*: a possible mechanism for benzo[a]pyrene-induced toxicity. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2014, 760(3): 64-69.

[9] Williams R, Hubberstey A V. Benzo(a)pyrene exposure causes adaptive changes in p53 and CYP1A gene expression in Brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). Aquatic Toxicology, 2014, 156: 201-210.

[10] Hamdi H, Benzarti S, Manusadžianas L, Aoyama I, Jedidi N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(8): 1926-1935.

[11] Wei B G, Yang L S. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. Microchemical Journal, 2010, 94(2): 99-107.

[12] Organization for Economic Cooperation and Development. No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 1984.

[13] 王慧, 张玉龙, 党秀丽, 任琳, 姬景红, 虞娜. 土壤镉、锌污染对蚯蚓纤维素酶活性的影响. 生态环境, 2008, 17(2): 661-665.

[14] 张薇, 宋玉芳, 刘森, 孙铁珩. 苯并(a)芘对蚯蚓细胞色素 P450 和抗氧化酶影响. 辽宁工程技术大学学报: 自然科学版, 2009, 28(5): 846-848.

[15] 赵作媛. 镉-菲复合污染对蚯蚓的急性毒性效应及抗氧化酶的影响[D]. 上海: 上海交通大学, 2007.

[16] 朱江. 镉-菲复合污染对安德爱胜蚓(*Eisenia andrei*)和白线蚓(*Fridericia bulbosa*)的生态毒理效应研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
[17] Marques C, Pereira R, Gonçalves F. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. Journal of Soils and Sediments, 2009, 9(2): 137-147.
[18] Wu S J, Wu E M, Qiu L Q, Zhong W H, Chen J M. Effects of phenanthrene on the mortality, growth, and anti-oxidant system of earthworms (*Eisenia fetida*) under laboratory conditions. Chemosphere, 2011, 83(4): 429-434.
[19] Li L Z, Zhou D M, Peijnenburg W J G M, Wang P, Van Gestel C A M, Jin S Y, Wang Q Y. Uptake pathways and toxicity of Cd and Zn in the earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(7): 1045-1050.
[20] 史志明. 菲在蚯蚓体内的分布及其对蚯蚓抗氧化防御体系的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
[21] Mekahlia M N, Tine S, Menasria T, Amieur H, Salhi H. *In vitro* biomarker responses of earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to herbicide sekator and phosphate fertilizer. Water, Air, & Soil Pollution, 2016, 227(1): 1-8.
[22] Shi Z M, Xu L, Hu F. A hierarchic method for studying the distribution of phenanthrene in *Eisenia fetida*. Pedosphere, 2014, 24(6): 743-752.
[23] 赵诏, 夏菊, 陶丽丹, 肖欢, 徐水, 朱勇. 重金属镉对家蚕生长发育及体内过氧化物酶和乙酰胆碱酯酶活性的影响. 蚕业科学, 2014, 40(3): 462-467.
[24] Gambi N, Pasteris A, Fabbri E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2007, 145(4): 678-685.
[25] Rao J V, Shilpanjali D, Kavitha P, Madhavendra S S. Toxic effects of profenofos on tissue acetylcholinesterase and gill morphology in a euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. Archives of Toxicology, 2003, 77(4): 227-232.
[26] Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R. Glutathione transferases. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2005, 45: 51-88.
[27] 宋长芹, 缪海飞, 朱斌, 佟少明, 李泽昀, 侯和胜. 植物谷胱甘肽-S-转移酶在植物修复中的作用. 安徽农学通报, 2010, 16(7): 56-56, 110-110.
[28] 张岩, 胡军, 郭长虹, 徐香玲, 李集临, 胡赞民. 植物谷胱甘肽-S-转移酶的分子生物学研究进展. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2007, 23(4): 76-79.
[29] Velki M, Hackenberger B K. Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests. Chemosphere, 2013, 90(3): 1216-1226
[30] Łaszczyca P, Augustyniak M, Babczynska A, Bednarska K, Kafel A, Migula P, Wilczek G, Witas I. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). Environment International, 2004, 30(7): 901-910.
[31] Li L Z, Zhou D M, Wang P, Luo X S. Subcellular distribution of Cd and Pb in earthworm *Eisenia fetida* as affected by Ca^{2+} ions and Cd-Pb interaction. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71(3): 632-637.
[32] Contreras-Ramos S M, Álvarez-Bernal D, Dendooven L. *Eisenia fetida* increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. Environmental Pollution, 2006, 141(3): 396-401.
[33] 段晓尘. 重金属和有机污染物对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)的生态毒理效应及机制差异[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
[34] Gao Y Z, Cao X Z, Kang F X, Cheng Z X. PAHs pass through the cell wall and partition into organelles of arbuscular mycorrhizal roots of ryegrass. Journal of Environmental Quality, 2011, 40(2): 653-656.
[35] Xiong W G, Ding X Y, Zhang Y M, Sun Y X. Ecotoxicological effects of a veterinary food additive, copper sulphate, on antioxidant enzymes and mRNA expression in earthworms. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2014, 37(1): 134-140.
[36] Mo X H, Qiao Y H, Sun Z J, Sun X F, Li Y. Molecular toxicity of earthworms induced by cadmium contaminated soil and biomarkers screening. Journal of Environmental Sciences, 2012, 24(8): 1504-1510.
[37] Yu S, Lanno R P. Uptake kinetics and subcellular compartmentalization of cadmium in acclimated and unacclimated earthworms (*Eisenia andrei*). Environmental Toxicology and Chemistry, 2010, 29(7): 1568-1574.
[38] Mosleh Y Y, Paris-Palacios S, Arnoult F, Couderchet M, Biagianti-Risbourg S, Vernet G. Metallothionein induction in aquatic oligochaete tubifex tubifex exposed to herbicide isoproturon. Environmental Toxicology, 2004, 19(1): 88-93.
[39] 高欢欢. 重金属 Cd 和 Zn 长期胁迫下麦长管蚜 *Sitobion avenae* 防御机制的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
[40] Tylko G, Banach Z, Borowska J, Niklińska M, Pyza E. Elemental changes in the brain, muscle, and gut cells of the housefly, *Musca domestica*, exposed to heavy metals. Microscopy Research and Technique, 2005, 66(5): 239-247.
[41] Stebbing A R D. Hormesis-The stimulation of growth by low levels of inhibitors. Science of the Total Environment, 1982, 22(3): 213-234.
[42] Pickett C B, Lu A Y. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. Annual Review of Biochemistry, 1989, 58: 743-764.
[43] Schreck E, Geret F, Gontier L, Treilhou M. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. Chemosphere, 2008, 71(10): 1832-1839.
[44] Lei F, Zhang L, Zhang Y N, Zhang P, Jiang H Y. Inhibition and recovery of biomarkers of earthworm *Eisenia fetida* after exposure to thiacloprid. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(12): 9475-9482.